Модель миелофиброза *in vitro* с использованием тромболизата человека

Е.Н. Булычева, Н.Т. Сиордия, Е.Г. Ломаиа, А.Ю. Зарицкий, П.А. Бутылин

Р Е Ф Е Р А Т

Разработка и изучение модели миелофиброза *in vitro* — актуальный вопрос, решение которого позволит выявить механизмы развития заболевания и потенциальные мишени для терапии. **Целью** работы было изучить свойства мезенхимных стволовых клеток (МСК) при их культивировании с использованием тромболизата от пациентов и здоровых доноров. **Пациенты и методы.** МСК от здоровых доноров и пациентов с первичным миелофиброзом (ПМФ) культивировали на средах с тромболизатом (ТЛ) различной концентрации. Оценивали пролиферативную активность МСК, экспрессию белков внеклеточного матрикса, способность к остеогенной и адипогенной дифференцировке. Концентрацию ростовых факторов (bFGF, VEGF, TGF-β, HGF) в ТЛ от пациентов с ПМФ (n = 14) и постполицитемическим миелофиброзом (n = 3) измеряли с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Пролиферативная активность МСК, культивированных на ТЛ высокой концентрации (10–20 %), статистически значимо не отличалась от контрольных условий. Отношение экспрессии гена коллагена III типа к коллагену I типа было максимальным при использовании 10% ТЛ. Использование ТЛ для культивирования МСК не приводило к изменению их способности к дифференцировке в остеогенном направлении, но при повышении концентрации ТЛ способность к адипогенной дифференцировке снижалась. Концентрации bFGF и VEGF в ТЛ от больных были статистически значимо выше, чем в контрольной группе (в 2,5 и 2,4 раза соответственно; p < 0,01). Концентрация TGF-β и HGF имела тенденцию к повышению, но статистически значимо не отличалась от контрольной группы (p = 0,2). Культивирование МСК на ТЛ от пациентов с миелофиброзом приводило к увеличению их пролиферативной активности. МСК от больных ПМФ в определенной степени усиливали пролиферацию при культивировании на ТЛ по сравнению с МСК от здоровых доноров. **Выводы.** Культивирование МСК на ТЛ может быть использовано как адекватная модель миелофиброза *in vitro*, т. к. приводит к профибротическим изменениям клеток стромы костного мозга.

Ключевые слова:

первичный миелофиброз, тромболизат, мезенхимные стволовые клетки, модель миелофиброза *in vitro*.

In vitro model of myelofibrosis using human platelet lysate

Ye.N. Bulycheva, N.T. Siordiya, E.G. Lomaia, A.Yu. Zaritskiy, and P.A. Butylin

ABSTRACT

The development and studies of the myelofibrosis (MF) *in vitro* model is an important issue, since such model can lead to understanding of pathogenesis and identifying the new targets for therapy. **Objectives.** Here, we studied the properties of mesenchymal stromal cells (MSCs) cultured in the medium containing the human platelet lysate (HPL). **Design and methods.** Bone marrow MSCs from healthy donors and a patient with primary myelofibrosis (PMF) were cultured in the media containing various HPL concentrations. We measured the proliferative activity, the collagen type I and III expression, and capability to differentiate into the osteogenic or adipogenic lineages. The concentrations of the vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor beta (TGF-β), and hepatocyte growth factor (HGF) were measured in HPL from patients with primary myelofibrosis or post-polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF) using the specific ELISA kits. **Results.** The highest MSC proliferative rate was found in the cultures with high HPL concentrations (10–20 %). The ratio of collagen type III/collagen type I expression was the highest in the cultures containing 10 % HPL. The use of HPL for MSCs culturing caused no changes in their osteogenic differentiation capability, but the increase in the HPL concentration resulted in the decreased capability to differentiate into the adipogenic lineage. Further, we observed the significantly increased VEGF and bFGF concentrations in HPL from MF patients, compared to the age-matched healthy controls (2.5- and 2.4-fold, respectively, p < 0.01), while the TGF-β and HGF concentrations showed the trend towards an increase, but with no significant difference from the controls. MSCs cultured with HPL from MF patients showed a higher proliferative rate compared to HPL from healthy donors. MSCs from the PMF patient tended to proliferate more actively compared to the cells from healthy donors. **Conclusion.** MSCs culturing using varying HPL concentrations can be used as an adequate MF *in vitro* model, since it leads to pro-fibrotic changes in the bone marrow stromal cells.

Keywords: primary myelofibrosis, platelet lysate, mesenchymal stromal cells, myelofibrosis *in vitro* model.

V.A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center
197341, ul. Akkuratova, d. 2, St. Peterburg, Russian Federation

Ye.N. Bulycheva, Junior scientific worker, RI of oncohematology
bulycheva.en@gmail.com

N.T. Siordiya, Scientific worker, RI of oncohematology

E.G. Lomaia, PhD, Leading scientific worker, RI of oncohematology

A.Yu. Zaritskiy, DSci, professor, Director, Institute of hematology

P.A. Butylin, PhD, Chief scientific worker, RI of oncohematology

Correspondence should be sent to E.N. Bulycheva
197341, ul. Akkuratova, d. 2, St. Peterburg, Russian Federation
Tel.: +7 (812) 702-37-06

Корреспондентский адрес:
Е.Н. Булычева
197341, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация
Тел.: +7 (812) 7023706

Принято в печать: 6 сентября 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Первичный миелофиброз (ПМФ) — клональное миелопролиферативное заболевание, особенностью которого являются раннее и значительное развитие фиброза костного мозга, а также миелоидная метаплазия селезенки.

Ежегодно число случаев заболевания ПМФ составляет 0,3–0,4 на 100 000 населения [1, 2]. Хотя за последние десятилетия медиана выживаемости имеет тенденцию к увеличению (от 4,6 до 6,5 года, по данным F. Cervantes и соавт. [3]), существенного прогресса в терапии

ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»
197341, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация

заболевания по-прежнему не наблюдается. Частота бластной трансформации (острого миелоидного лейкоза) как поздней стадии ПМФ составляет до 30 % [3, 4].

В настоящее время считается, что ключевое значение в процессе фиброзирования костного мозга имеют биологически активные молекулы, продуцируемые мегакариоцитами, тромбоцитами и моноцитами [5, 6]. Акцепторами этих факторов выступают, вероятно, клетки стромы костного мозга, что приводит к накоплению ретикулиновых волокон в костномозговой ткани. Наибольший интерес представляют трансформирующий фактор роста (TGF-β), факторы роста тромбоцитов (PDGF), фибробластов (bFGF), эндотелия сосудов (VEGF) и тромбоцитарный (PF4). Примечателен тот факт, что эти молекулы, будучи регуляторами биосинтеза внеклеточного матрикса, также влияют на пролиферацию фибробластов и эндотелиальных клеток [7].

В настоящее время существует несколько моделей *in vivo*, позволяющих получать изменения, напоминающие ПМФ. Одну из этих моделей представляют мыши с гиперэкспрессией гена тромбопоэтина — основного физиологического фактора, стимулирующего мегакариоцитопоэз [8]. Комплекс симптомов, развивающийся у этих животных, включает значительно повышенный уровень тромбопоэтина, гиперплазию мегакариоцитов в костном мозге, селезенке, печени и лимфатических узлах, повышенное число тромбоцитов, а также миелофиброз и остеосклероз, развивающиеся через 10 нед. после трансплантации.

Вторая модель, разработанная группой исследователей во главе с A.M. Vannucchi, свидетельствует о том, что дефект гена *GATA1* с течением времени приводит у мышей к клинической картине, соответствующей ПМФ [9]. Фактор транскрипции GATA1 участвует в генерации из стволовой клетки мегакариоцитарных и эритроидно-мегакариоцитарных предшественников. При дефекте данного гена у мышей наблюдалась тяжелая тромбоцитопения, однако число мегакариоцитов в костном мозге и селезенке было повышено. В культурах такие мегакариоциты характеризовались резко выраженной пролиферативной активностью, однако формирование тромбоцитов было снижено [9]. Фиброостеосклеротические изменения в костном мозге начинались в возрасте 1 года и становились очевидными в течение последующих 6 мес. Миелоидная метаплазия, как правило, развивалась в селезенке и печени, реже — в легких.

Благодаря созданию мышиных моделей с мутацией Jak2 V617F в гемопоэтических клетках был определен фенотип истинной полицитемии [10], однако фиброз костного мозга при этом был выражен незначительно. Экспрессия мутантного Jak2 под промотором vav позволила получить мышиную модель, более приближенную по клиническим признакам к ПМФ с развитием трехростковой гиперплазии в костном мозге и селезенке, спленомегалии, с понижением уровня эритро- и тромбопоэтина [11, 12].

Наконец, было показано, что трансплантация гемопоэтических клеток CD133+CD34+ от пациентов с ПМФ мышам с иммунодефицитом позволяет воспроизводить все фазы заболевания [13].

Модель ПМФ *in vitro* может быть сформирована при культивировании клеток стромы костного мозга в условиях, приводящих к усилению их профибротических свойств. Добавление тромболизата (ТЛ) в питательные среды может быть примером таких условий. Возможности использования ТЛ человека для культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) в настоящее время активно изучаются и представляются перспективными [14–16].

ТЛ способствует более быстрому росту колоний МСК, но не увеличению их количества, поэтому время достижения слияния уменьшается. По всей видимости, такой эффект реализуется за счет ростовых факторов (bFGF, TGF-β, PDGF и др.), число которых в ТЛ достаточно для увеличения количества МСК, что делает культивирование в данных условиях экономически выгодным. Их функциональные характеристики, такие как способность к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке, согласно литературным данным, принципиально не изменялись [17], хотя различия ТЛ от разных доноров могут вносить некоторую вариабельность [18].

Целью данной работы было изучить свойства мезенхимных стволовых клеток при культивировании их на тромболизате человека (как пример модели первичного миелофиброза *in vitro*).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Образцы венозной крови объемом 8–12 мл были получены от 14 пациентов с диагнозом ПМФ и от 3 — с постполицитемическим миелофиброзом. Средний возраст пациентов составил 60 лет (диапазон 24–79 лет). Средняя длительность заболевания от момента верификации диагноза была 75 мес. (диапазон 1–252 мес.). Ко времени обследования 12 больных уже получали лечение (гидроксимочевина, преднизолон, интерферон-α). Терапию дезагрегантами получали 9 пациентов, при этом последний прием препарата приходился на вечер дня, предшествовавшего забору крови. Контрольные образцы были получены от 7 доноров (3 мужчин и 4 женщин), не имеющих гематологических и других хронических системных заболеваний. Средний возраст доноров составил 60 лет (диапазон 55–65 лет).

Получение тромболизата

Венозную кровь (8–12 мл) у больных миелофиброзом и в контрольной группе доноров забирали в вакуумные пробирки с K_3-ЭДТА. Затем центрифугировали при 300 g в течение 10 мин для получения плазмы, богатой тромбоцитами, которую разводили в соотношении 1:1 в фосфатно-буферном растворе и центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок замораживали при температуре –40 °C. Замораживание и оттаивание осуществлялись трижды для лизирования тромбоцитов, после чего лизат центрифугировали для осаждения мембран тромбоцитов. Полученная надосадочная жидкость и была тромболизатом. ТЛ здоровых доноров получали из пулированного тромбоконцентрата, предоставленного станцией переливания крови ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова».

Получение мезенхимных стволовых клеток костного мозга

Аспирация костного мозга осуществлялась квалифицированным персоналом в условиях манипуляционной

гематологического отделения. Забор образцов аспирата костного мозга для выделения клеточных популяций проводился в пробирки с K_3-ЭДТА. Для получения фракции мононуклеаров из костного мозга применяли центрифугирование в градиенте фиколла с использованием реагента Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, США). Для селекции по адгезии выделенные на фиколльном градиенте клетки высевали в культуральные флаконы и культивировали в минимальной среде. Используется игла в модификации альфа с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), L-глутамина и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин, гентамицин). Через 24–48 ч неприкрепившиеся клетки отмывали. Смена питательной среды осуществлялась 1 раз в 2–3 дня. Для получения следующего пассажа МСК их переносили во фласки площадью 75 $см^2$ и далее культивировали с использованием культуральной среды во влажной атмосфере с 6% CO_2 при температуре 37 °С.

Оценка пролиферативной активности мезенхимных стволовых клеток

Количество жизнеспособных клеток в культуре определяли колориметрическим методом с помощью реагента MTT [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид; Sigma]. Метод основан на том, что митохондриальные ферменты способны восстанавливать желтый MTT до пурпурного формазана. Поскольку эта реакция происходит только в живых клетках, количество формазана зависит от числа живых клеток в популяции. Кристаллы MTT растворяли в фосфатно-буферном растворе в концентрации 5 мг/мл. Полученный раствор разбавляли в 10 раз и добавляли к клеткам, после чего инкубировали их при температуре 37 °С в течение 2 ч. Для растворения кристаллов формазана к клеткам добавляли диметилсульфоксид. Спустя несколько минут, после растворения всех кристаллов, при комнатной температуре измеряли интенсивность окрашивания при длине волны 570 нм на спектрофотометре Synergy 2 (BioTeK, США).

Выделение РНК, синтез кДНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для выделения РНК использовали наборы RNeasy Mini Kit (Quiagen, США). Затем определяли концентрацию и чистоту полученной РНК на спектрофотометре Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, США). Синтезировали кДНК с помощью MMLV Reverse Transcriptase kit («Евроген», Россия). Количественную ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+ROX kit («Евроген», Россия) в 20 мкл реакции с 10 мМ праймерами к коллагену I и III типов, 5 мкл кДНК и 4 мкл SYBR Green PCR Master Mix.

Использовались следующие последовательности праймеров («Бигль», Россия):

- коллаген I типа:
  - прямой CAT GTT CAG CTT TGT GGA CC;
  - обратный TTC TGT ACG CAG GTG ATT GG;
- коллаген III типа:
  - прямой GCC AAA TAT GTG TCT GTG ACT CA;
  - обратный GGG CGA GTA GGA GCA GTT G.

Условия реакции были следующими: начальная денатурация при температуре 95 °С в течение 10 мин, затем 40 циклов — денатурация при 95 °С (30 с), отжиг праймеров при 62 °С (30 с) и элонгация при 72 °С (1 мин).

Определение способности мезенхимных стволовых клеток к остеогенной и адипогенной дифференцировке

Для стимуляции адипогенной дифференцировки использовали индуктор следующего состава: 1 мкМ дексаметазона, 5 мкг/мл инсулина (Gibco-BRL; Carlsbad), 0,5 мМ изобутилметилксантина. Для стимуляции остеогенной дифференцировки: 1 мкМ дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата и 50 мкМ аскорбиновой кислоты. Перечисленные реагенты добавляли к обычной культуральной среде, использовались реагенты производства Sigma-Aldrich (США). Для индукции дифференцировки культуральную среду в лунках заменяли на остеогенный или адипогенный дифференцирующие растворы и инкубировали во влажной атмосфере с 6% CO_2 при температуре 37 °С. Остеогенная дифференцировка индукторами длилась 3 нед., адипогенная — 2 нед. Идентификация адипогенной дифференцировки проводилась с помощью красителя масляного красного, а остеогенной — ализаринового красного. После окрашивания краситель удаляли и фотографировали лунки для определения результатов дифференцировки.

Измерение концентрации ростовых факторов в тромболизате от пациентов с первичным и постполицитемическим миелофиброзом

Для иммуноферментного анализа с целью количественно определить факторы роста (bFGF, VEGF, TGF-β, HGF) в ТЛ от пациентов использовались стандартные наборы (R&D Systems). ТЛ предварительно уравнивали по количеству белка с помощью реагента BCA (бицинхониновая кислота): инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин, после чего регистрировали интенсивность окрашивания при 562 нм. Полученная концентрация белка в разведенных ТЛ соответствовала 5% раствору ТЛ от здоровых доноров. Затем 100 мкл образца добавляли в лунки 96-луночной платы, предварительно обработанные связывающими антителами. Спустя 2 ч лунки промывали и добавляли меченные ферментом специфические антитела. После добавления субстрата (H_2O_2) и последующей остановки реакции интенсивность окраски растворов измеряли при длине волны 450 нм на спектрофотометре Synergy 2 BioTeK.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология клеток при культивировании в разных условиях

На стадии субконфлюентности наблюдались определенные отличия в морфологии клеток стромы костного мозга при культивировании в различных условиях (рис. 1). В случае использования 10% ФБС чаще встречались крупные вытянутые клетки, расположенные менее компактно, чем при культивировании на ТЛ. При использовании 10 и 20% ТЛ в основном наблюдались небольшие округло-веретенообразные клетки. При более высокой концентрации ТЛ клетки приобретали тенденцию к более компактному (кучному) и менее равномерному заполнению площади пластика. Представляет некоторые трудности количественное описание наблюдаемых различий, однако

Рис. 1. Клетки стромы костного мозга при культивировании в разных условиях через 72 ч, × 50:
А — 10% фетальная бычья сыворотка; *Б* — 10% тромболизат человека; *В* — 20% тромболизат человека

известно, что подобные типы субпопуляций МСК и их пространственное расположение в культуре были ранее показаны в литературе [18].

Пролиферативная активность мезенхимных стволовых клеток

При культивировании МСК в средах с различным содержанием ТЛ максимальное количество жизнеспособных клеток на 7–9-й день наблюдалось при высокой концентрации ТЛ — 15–30 % (рис. 2).

При данных концентрациях количество клеток статистически значимо не отличалось от такового при культивировании МСК на 10% ФБС (по данным *t*-теста Стьюдента для 15% ТЛ $p = 0,07$, для 20% ТЛ $p = 0,12$, для 30% ТЛ $p = 0,07$). В остальных случаях количество клеток было статистически значимо меньше ($p \leq 0,01$). В целом полученные результаты сходны с известными из литературных источников [18], хотя некоторые авторы отмечали даже большую экспансию МСК при культивировании на ТЛ, чем при использовании ФБС [14].

Соотношение экспрессии генов коллагена I и III типов

Количественная ПЦР в реальном времени позволила выявить следующие закономерности: при культивировании МСК в течение 11 дней экспрессия гена коллагена I типа снижалась при увеличении концентрации ТЛ в среде. При любой концентрации ТЛ экспрессия его была ниже, чем при культивировании в стандартных условиях (10% ФБС). Обратная тенденция обнаруживалась в отношении коллагена III типа: при 5 и 10% ТЛ в среде экспрессия этого гена была выше, чем при 10% ФБС. Некоторое снижение наблюдалось только при 15% ТЛ. Таким образом, представляется важным изменение соотношения экспрессии генов коллагена I и III типов (рис. 3): при культивировании МСК на ТЛ при любой его концентрации отношение экспрессии гена коллагена III типа к коллагену I типа выше, чем в стандартных условиях. Максимальное различие обнаруживается в случае 10% ТЛ.

Направления дифференцировки мезенхимных стволовых клеток

После индукции МСК не было обнаружено тенденции к изменению остеогенной дифференцировки в зависимости от культуральных условий (рис. 4). Интенсивность окраски ализариновым красным визуально была одинаковой во всех лунках, что свидетельствует о сохранении способности МСК к дифференцировке в остеобласты при культивировании с ТЛ. Согласно литературным данным, не

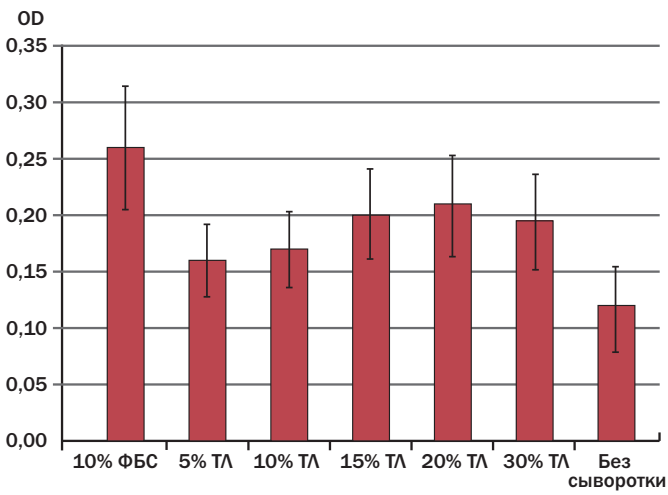

Рис. 2. Оптическая плотность (OD) при использовании метода МТТ в культурах мезенхимных стволовых клеток, выращенных в различных условиях
ТЛ — тромболизат; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

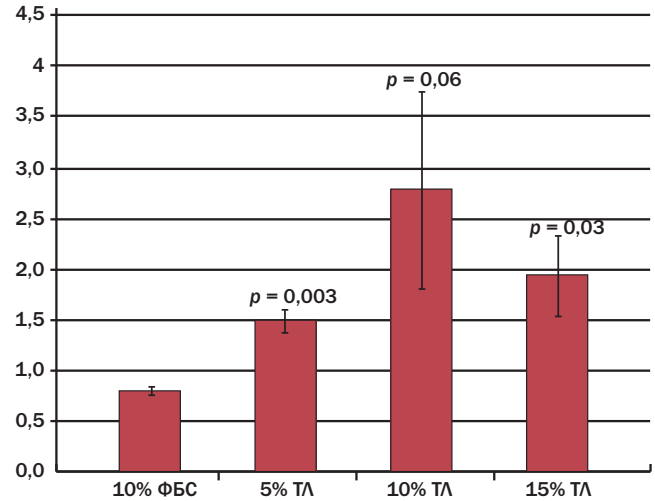

Рис. 3. Соотношение экспрессии генов коллагена I и III типов на 11-й день культивирования мезенхимных стволовых клеток в различных условиях
ТЛ — тромболизат; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

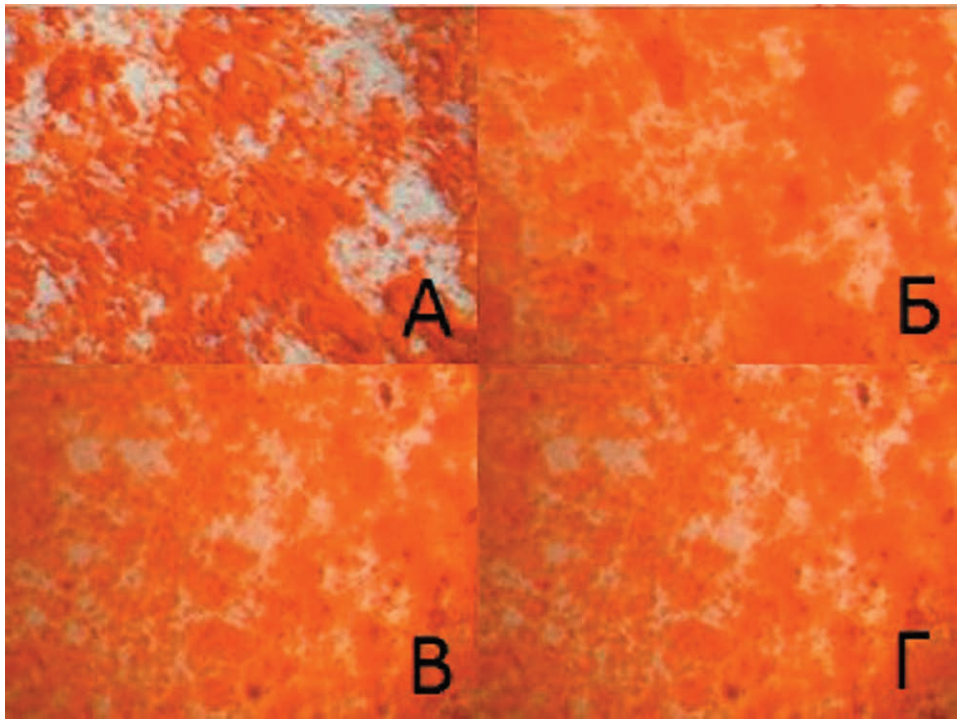

Рис. 4. Окраска мезенхимных стволовых клеток ализариновым красным на кальцинированный белок, × 50:
А — 10% фетальная бычья сыворотка; *Б* — 5% тромболизат; *В* — 10% тромболизат; *Г* — 20% тромболизат

исключено, что ТЛ способствует некоторому увеличению остеогенной дифференцировки по сравнению с использованием стандартной сыворотки [14, 18], однако в наших экспериментах не удалось получить значимой разницы.

При индукции адипогенной дифференцировки визуально наблюдалась четкая тенденция к снижению числа адипоцитов, т. е. клеток, окрашенных на липидные гранулы масляным красным, при повышении концентрации ТЛ в среде (рис. 5). Это также коррелирует с данными литературы.

Визуальные данные о снижении способности к адипогенной дифференцировке подтверждаются при прямом подсчете адипоцитов при микроскопии (рис. 6). В стандартных условиях (10% ФБС) и при культивировании МСК на 5% ТЛ количество адипоцитов статистически значимо не отличалось ($p = 0{,}06$), тогда как при 10 и 20% ТЛ количество этих клеток было статистически значимо меньше ($p = 0{,}009$ и $p = 0{,}04$ соответственно).

Культивирование мезенхимных стволовых клеток на тромболизате от пациентов

При культивировании МСК на ТЛ, полученном от пациентов, на 3-й день статистически значимых различий в количестве жизнеспособных клеток не отмечалось ($p = 0{,}2$). Однако имелась тенденция, подтвержденная неоднократными повторами опыта, к более активной пролиферации клеток стромы при культивировании их на ТЛ от больных (рис. 7).

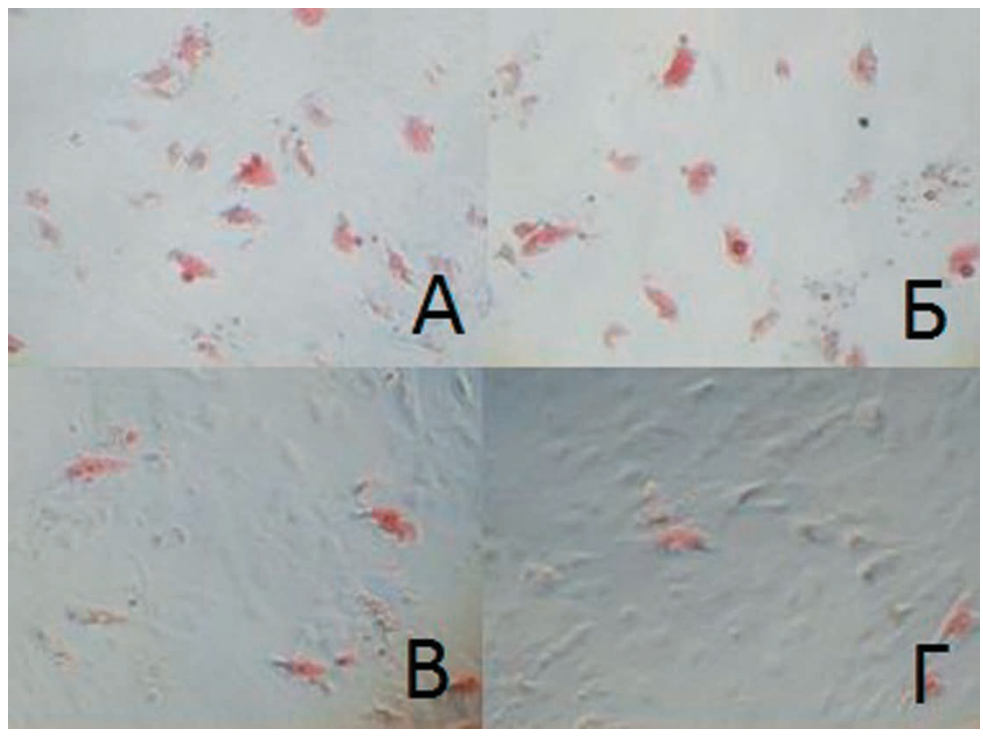

Рис. 5. Окраска адипоцитов жирорастворимым красным, × 50:
А — 10% фетальная бычья сыворотка; *Б* — 5% тромболизат; *В* — 10% тромболизат; *Г* — 20% тромболизат

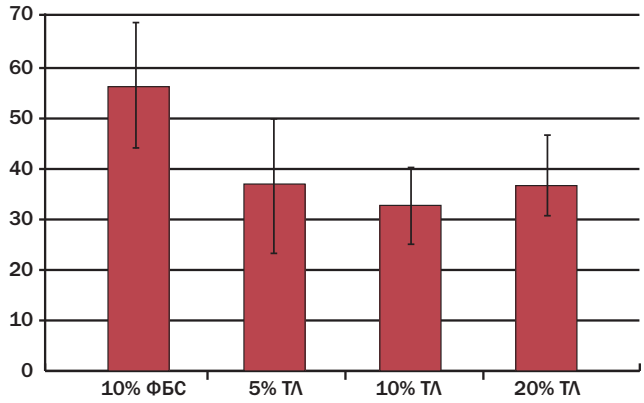

Рис. 6. Количество адипоцитов в поле зрения при прямом подсчете (микроскопия)
ТЛ — тромболизат; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

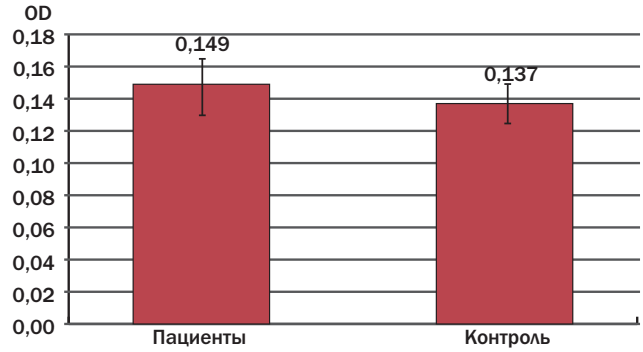

Рис. 7. Оптическая плотность (OD) при использовании метода МТТ в культурах мезенхимных стволовых клеток, выращенных на тромболизате от пациентов и доноров (контрольная группа)

Содержание ростовых факторов в тромболизате

Нами было обнаружено, что концентрация ростовых факторов bFGF и VEGF, которые играют важную роль в патогенезе миелофиброза, была повышена в ТЛ от больных по сравнению с донорами контрольной группы. Среднее содержание bFGF при этом составило в группе больных 172,67 пг/мл, а в контрольной группе — 72,7 пг/мл. Различие между двумя группами было статистически значимо ($p = 0{,}0009$). Средняя концентрация VEGF также статистически значимо отличалась ($p = 0{,}01$). В группе больных она составляла 514,25 пг/мл, а в контрольной группе — 205,26 пг/мл (рис. 8).

Концентрация TGF-β в группе пациентов была выше, чем в контрольной (1847,7 и 1515,9 пг/мл соответственно). Однако различие было статистически незначимым ($p = 0{,}2$). Аналогичная ситуация наблюдалась для HGF: в ТЛ от пациентов его концентрация составляла 0,08 пг/мл, в контрольной группе — 0,05 пг/мл ($p = 0{,}2$).

Культивирование мезенхимных стволовых клеток от больного первичным миелофиброзом на тромболизате

Получение МСК от больных ПМФ представляет некоторые трудности, поскольку аспирация фиброзированного костного мозга не всегда бывает возможной. Полученные МСК от больного ПМФ мы также культивировали на средах с различным содержанием ТЛ и 10% ФБС в качестве контроля. В целом тенденция к возрастанию пролиферативной активности с увеличением концентрации ТЛ сохранялась. Статистически значимые отличия пролиферативной активности МСК от здоровых доноров и от больного ПМФ наблюдались при культивировании клеток на 10 и 20% ТЛ ($p = 0{,}03$ и $p = 0{,}04$ соответственно). Однако тенденция к более активному росту клеток от больного прослеживалась во всех случаях (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ТЛ как источник тромбоцитарных ростовых факторов оказывает стимулирующее влияние на клетки стромы костного мозга. Поскольку основным клеточным звеном в патогенезе миелофиброза рассматриваются мегакариоциты и связанная с изменением их функционирования повышенная концентрация ростовых факторов в строме костного мозга, то воспроизведение данного звена патогенеза возможно с помощью лизата тромбоцитов, содержащих те же факторы. Таким образом, культивирование мезенхимных стволовых клеток с добавлением тромболизата чело-

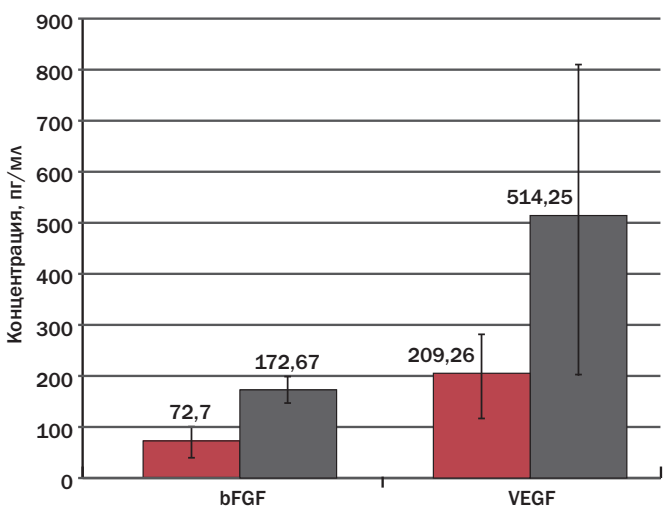

Рис. 8. Содержание ростовых факторов в тромболизате от пациентов и доноров (контрольная группа)

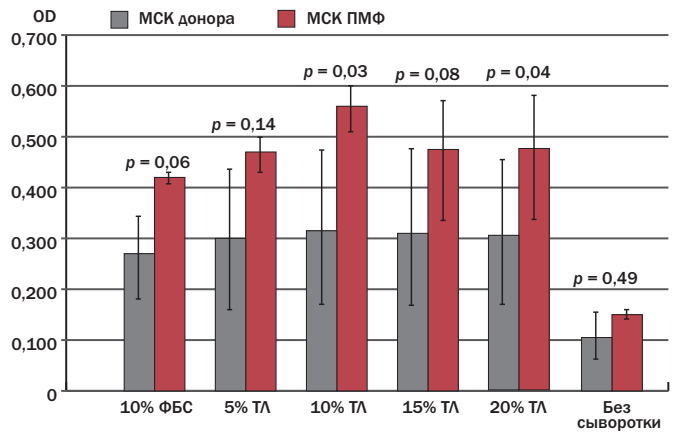

Рис. 9. Культивирование мезенхимных стволовых клеток (МСК) от здоровых доноров и больного первичным миелофиброзом (ПМФ) с использованием различных концентраций тромболизата
OD — оптическая плотность; ТЛ — тромболизат; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

века может рассматриваться как модель первичного миелойфиброза *in vitro*.

Усиление пролиферативной активности, проявляющееся в увеличении количества жизнеспособных клеток при повышении концентрации ТЛ в среде, указывает на дозозависимое влияние в определенных границах тромбоцитарных факторов на способность клеток к митозу. Некоторое уменьшение интенсивности сигнала при максимальной (30%) концентрации по сравнению с 15–20%-ным уровнем ТЛ при проведении теста МТТ может быть объяснено проявлением действия ингибирующих факторов, содержащихся в лизате, после вовлечения предельного количества рецепторов активирующих факторов роста на МСК. Однако эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

Усиление экспрессии коллагена III типа, а также повышение его доли по отношению к коллагену I типа в составе белков внеклеточного матрикса при культивировании МСК в средах с ТЛ по сравнению со стандартными условиями культивирования позволяют предположить, что тромбоцитарные факторы роста имеют большое значение в фиброзировании костного мозга, изменяя состав образуемого клетками стромы внеклеточного матрикса.

Снижение способности к адипогенной дифференцировке и сохранение (а возможно, даже усиление) остеогенной объясняют возможность развития стадии остеомиелосклероза после миелофибротической под воздействием тромбоцитарных факторов, минуя выраженное жировое перерождение костного мозга.

Отсутствие значимых различий между пролиферативной активностью МСК при их культивировании на ТЛ от больных миелофиброзом и доноров контрольной группы может подтверждать высказанную ранее идею A. Schmitt и соавт. о том, что содержание ростовых факторов в тромбоцитах больных не отличается от нормы, а нарушен только способ их высвобождения [19]. Однако наши результаты по прямому измерению количества тромбоцитарных факторов роста (bFGF, VEGF) в ТЛ свидетельствуют об обратном. Данное явление может быть объяснено недостаточно длительным культивированием клеток в этих условиях. Возможно, при увеличении времени эксперимента имеющаяся тенденция к усилению пролиферации МСК на ТЛ от больных станет более очевидной.

Повышение уровня bFGF и VEGF, а также тенденция к повышению TGF-β и HGF в ТЛ от больных миелофиброзом свидетельствует о важной роли этих факторов в изменении функционирования клеток стромы костного мозга. В дальнейшем целесообразно изучить более широкий спектр факторов роста для всесторонней характеристики влияния содержимого α-гранул тромбоцитов и мегакариоцитов на МСК.

Тенденция к усилению пролиферативной активности МСК от больных миелофиброзом по сравнению с МСК от здоровых доноров может свидетельствовать не только о влиянии микроокружения на клетки стромы, но и об изменениях в самих клетках, способствующих усилению их профибротических свойств. Хотя ранее было показано, что клетки стромы не содержат мутаций, характерных для развития ПМФ, изменения в костном мозге могут приводить к закреплению патологических свойств клетками стромы, возможно, за счет эпигенетических механизмов.

Влияние выявленных нами изменений в тромбоцитах пациентов с миелофиброзом на физиологию клеток стромы костного мозга может быть воспроизведено в культуре при использовании ТЛ от здоровых доноров для культивирования МСК. Дальнейшее изучение этой модели может привести к поиску новых факторов, ответственных за формирование профибротического фенотипа МСК, и, соответственно, новых подходов к терапии миелофиброза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам НИЛ онкогематологии и НИЛ межклеточных взаимодействий ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» за оказание помощи в выполнении исследования, а также врачам отделения гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» и кафедры факультетской терапии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова за помощь в отборе пациентов с миелофиброзом, а также станции переливания крови ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» за предоставленный тромбоконцентрат.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Финансовая поддержка исследования осуществлялась за счет гранта «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток». Государственный контракт № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 г., а также «Субсидии молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2012 г.» от комитета по науке и высшей школе правительства Санкт-Петербурга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kutti J., Ridell B.* Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. Pathol. Biol. 2001; 49: 164–6.

2. *Johansson P., Kutti J., Andreasson B. et al.* Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983–99. J. Inter. Med. 2004; 256: 161–5.

3. *Cervantes F., Dupriez B., Passamonti F. et al.* Improving survival trends in primary myelofibrosis: an international study. J. Clin. Oncol. 2012; 30: 2981–7.

4. *Barosi G., Ambrosetti A., Finelli C. et al.* The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. Br. J. Haematol. 1999; 104(4): 730–7.

5. *Колосков А.В.* Мегакариоциты и фиброз костного мозга. Гематол. и трансфузиол. 1997; 42: 29–31.

Koloskov A.V. Megakariotsity i fibroz kostnogo mozga [Megakaryocytes and bone marrow fibrosis. In: Hematol. & transfuziol.]. Gematol. i transfuziol. 1997; 42: 29–31.

6. *Reilly J.T.* Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment. Hematol. Oncol. 2006; 24: 56–63.

7. *Le Bousse-Kerdiles M.-C., Martyre M.-C., Samson M.* Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. Eur. Cytokine Netw. 2008; 19: 69–80.

8. *Yan X.Q., Lacey D., Fletcher F. et al.* Chronic exposure to retroviral encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. Blood 1995; 86: 4025–33.

9. *Vannucchi A.M., Bianchi L., Paoleti F. et al.* Impaired GATA-1 expression and myelofibrosis in an animal model. Pathol. Biol. 2004; 52: 275–9.

10. *Xing S., Wanting T.H., Zhao W. et al.* Transgenic expression of Jak2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. Blood 2008; 111: 5109–17.

11. *Wernig G., Mercher T., Okabe R. et al.* Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 2006; 107: 4274–81.

12. *Kirabo A., Park S.O., Wamsley H.L. et al.* The small molecule inhibitor G6 significantly reduces bone marrow fibrosis and the mutant burden in a mouse model of Jak2-mediated myelofibrosis. AJP 2012; 181: 858–65.

13. *Triviai I., Stubing Th., Niebuhr B. et al.* A mouse model for human myelofibrosis. 18th Congress of EHA 2013: Abstract P248.

14. *Xia W., Li H., Wang Zh. et al.* Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-

derived mesenchymal stem cells. Cell Biol. 2011; Manuscript CBI20100361: 1–10.

15. *Sankaranarayanan K., Chandana T., Gency Ponrose G. et al*. Humanized substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation. Cell Biol. Intern. 2011; Manuscript CBI20100649.

16. *Jenhani F., Durand V., Ben Azouna N. et al*. Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells. Transplant. Proceed. 2011; 43: 639–43.

17. *Doucet Ch., Ernou I., Zhang Y. et al*. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. J. Cell. Physiol. 2005; 205: 228–36.

18. *Horn P., Bokermann G., Cholewa D. et al*. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2010; 12: 888–98.

19. *Schmitt A., Jouault H., Guichard J. et al*. Pathologic interaction between megacaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. Blood 2000; 96: 1342–7.